⑲ 日本国特許庁（JP）　⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報（A）　昭63-66192

⑤Int.Cl.⁴	識別記号	庁内整理番号
C 07 H 11/00		7138-4C
A 61 K 31/70	ADS	7252-4C
C 08 B 37/10		6779-4C

㊸公開 昭和63年（1988）3月24日

審査請求 未請求 発明の数 4 （全28頁）

㊹発明の名称 細胞の成長因子に親和性を示すヘパリン系少糖類

㉑特　願 昭62-92122

㉒出　願 昭62（1987）4月16日

優先権主張 ㉜1986年4月17日㉝フランス（FR）㉛8605546

⑫発明者 ジヤン－クロード・ロルミユー　フランス国、76150 マローム、リユー・デユ・8・メー、34

⑫発明者 モーリス・プテイトウー　フランス国、75645 パリ、セデツクス 13、リユー・デユ・ジヤヴロー、65、ツール・メキシコ（番地なし）

⑫発明者 ジヤン・ショアイ　フランス国、75007 パリ、リユー・サン・ギヨーム、21

⑪出願人 サノフイ　フランス国、75008 パリ、アヴニユー・ジヨルジユ・サンク、40

⑭代理人 弁理士 津国 肇

明　細　書

1．発明の名称

細胞の成長因子に親和性を示すヘパリン系少糖類

2．特許請求の範囲

1）鎖によって形成された生成物であり、

ヘパリンを認識するカチオン性もしくはアニオン性の細胞成長因子に対して特異的な親和性を示し、

第1図に示したRMNスペクトルの特徴を表わす強アニオン性を示し、天然ヘパリンに存在する単位に対応した5つの単位の少くとも1つの連鎖を含むことを特徴とする、

ヘパリン型又は硫酸ヘパラン型の少糖類、又は医薬として認容可能なその塩。

2）基本的に鎖によって形成された生成物であり、

次式Ⅰ：

－(G－H)ₙ－G－又は－H－(G－H)ₙ　（Ⅰ）

で示される糖類の単位の連鎖を有する、

式中、nは2～6の数を表し、

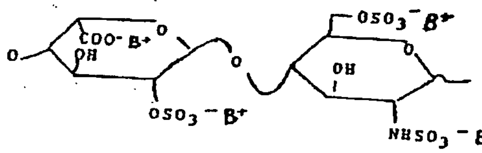
G－Hは、（イズロン酸・2－O－サルフェート）－（D－グルコサミン・NH－サルフェート6－O－サルフェート）の構造の二糖類の鎖状構造に対応し

Gは、L－イズロン酸・2－サルフェートの構造の単位を表わし、

Hは、D－グルコサミン・NH－サルフェート・6－O－サルフェートの構造の単位を表わし、

ヘパリンを認識するカチオン又はアニオンの細胞成長因子に対して特異的な親和性を示すことを特徴とする、ヘパリン型又は硫酸ヘパラン型の少糖類又は医薬として認容可能なその塩。

3）二糖類の鎖状構造G－Hが次式Ⅱ：



Ⅱ

BEST AVAILABLE COPY

に対応し、式中、B⁺は、生理学的に許容される塩を与える無機もしくは有機のカチオンを表わす特許請求の範囲第1項又は第2項記載の少糖類。

4）次式Ⅲ：

$$R(GH)_nR' \qquad (\text{Ⅲ})$$

に対応し、式中、

Rは、水素原子を表わすか、又は、G－H型の二糖類の単位を表わし、ここに単位Gは、ヘパリン鎖に対応する単位に対して必要により化学的に変性されており、

R'は、水素原子を表わすか、又は、二糖類の単位G－Hを表わし、ここに単位Hは、ヘパリン鎖に対応する単位に対して必要により化学的に変性されており、

ここに、R及びR'は、変性された単位を含めた少糖類の糖単位の全数が多くとも14に等しくなるような意味をもつことを特徴とする特許請求の範囲第1～3項の一に記載の少糖類。

5）1位の不斉炭素又は4位にそれぞれ－OH

基を有する糖単位を非還元末端及び還元末端に有することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の少糖類。

6）ヘパリン鎖の対応する単位に対して変性された形式の単位又は不活性の有機基を非還元末端及び／又は還元末端に有することを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の少糖類。

7）α，β不飽和ウロン単位を非還元末端に有し、そして／又は、2，5－無水マンノ、好ましくは2，5－無水マンニトール又は2，5無水マンノン酸の構造単位を還元末端に有することを特徴とする特許請求の範囲第6項記載の少糖類。

8）6個の糖単位を含む鎖によって形成され、還元末端又は非還元末端にある終単位が必要に応じて化学的に変性されていることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の少糖類。

9）第1図に示したRMNスペクトルに対応するヘパリン認識細胞成長因子に対して親和性を

示す六糖類。

10）0.5N NaCℓ緩衝液（pH、6.0）によって平衡させたアガロース－アクリルアミド45ℓを含有する100cm×25cmのカラム上においてヘパリンの硝酸解重合混合物のアルコール沈殿によって得た沈殿物60gを、0.5M NaCℓ500mℓ溶液中に溶かし、1時間1500mℓの流量で溶離を行なって、ゲル沪過系中32ℓ～36ℓの容積の間に溶離させたフラクションに対応するフラクション中に含まれる生成物に対応することと、

この生成物が、トリス－HCℓ、0.01M、pH7.4、0.2M NaCℓ緩衝液によって平衡されたFGFアニオンセファロース（登録商標）30mℓを含有する2.5cm×6.5cmのカラムを使用し、このカラム上に、前記と同じ緩衝液60mℓ中に溶解させた前記フラクション300mgを施し、1M NaCℓに調節した緩衝液を用いて溶離し、エタノールを用いて回収した該フラクションの少糖類を沈殿させて、FGFア

ニオンセファロース（登録商標）上にアフィニティクロマトグラフィによって分離されたものである

ことを特徴とする六糖類。

11）還元末端又は非還元末端に必要に応じて化学的に変性された8個の糖単位を含む鎖が形成されたことを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の少糖類。

12）0.5N NaCℓ緩衝液（pH、6.0）によって平衡させたアガロース－アクリルアミド45ℓを含有する100cm×25cmのカラム上においてヘパリンの硝酸解重合混合物のアルコール沈殿によって得た沈殿物60gを、0.5M NaCℓ500mℓ溶液中に入れ、1時間1500mℓの流量で溶離を行なって、ゲル沪過系28ℓ～32ℓの容積の間に溶離させたフラクションに対応するフラクション中に含まれる生成物に対応することと、

この生成物が、トリス－HCℓ0.01M、pH7.4、0.2M NaCℓ緩衝液によって

平衡された、FGFアニオン－セファロース（登録商標）３０mlを含有する２．５cm×６．５cmのカラムを使用し、このカラム上に、前記と同じ緩衝液８０ml中に溶解させた前記フラクション３００mgを施し、１M　NaCℓに調節した緩衝液を用いて溶離し、エタノールを用いて回収した該フラクションの少糖類を沈殿させてFGFアニオンセファロース（登録商標）上にアフィニティクロマトグラフィによって分離されたものである

ことを特徴とする八糖類。

13）還元末端又は非還元末端に必要に応じて化学的に変性された１０個の糖単位を含む鎖が形成されたことを特徴とする特許請求の範囲第１項又は第２項記載の少糖類。

14）特許請求の範囲第１１項に記載したゲル濾過系中２５～２８ℓの溶離容積に対応するフラクションに含まれ、特許請求の範囲第１１項に示された条件の下にFGF－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィによって分離されたことを特徴とする十糖類。

15）還元末端又は非還元末端に必要に応じて化学的に変性された１２個の糖単位を含む鎖によって形成されたことを特徴とする特許請求の範囲第１項又は第２項記載の少糖類。

16）所定のイオン強度の緩衝液を使用してヘパリン型グリコサミノグリカン調製物をアニオン性もしくはカチオン性成長因子と接触させ、該成長因子に対して親和性を示さない鎖又は中庸の親和性を示す鎖を除去し、次に、該成長因子上に固定された糖類の鎖を回収することを特徴とする特許請求の範囲第１～１５項の一に記載の少糖類を製造する方法。

17）支持体上に固定されたアニオン性成長因子を使用することを特徴とする特許請求の範囲第１６項記載の製造方法。

18）出発グリコサミノグリカン調製物が、ATⅢに対する結合サイトをもった鎖を除去した調製物であり、自然のヘパリンもしくは硫酸ヘパランの鎖の混合物、これらの自然のヘパリンもしくは硫酸ヘパランの鎖の解重合フラグメント又は多くとも１４単位を含むフラグメントもしくは鎖の混合物によって形成されることを特徴とする特許請求の範囲第１６項又は第１７項記載の製造方法。

19）多くとも１４糖単位を含む鎖の混合物が、変性された単位、特にα－β不飽和ウロン単位を還元末端に有するか、又は、特に２，５－無水マンノ単位を還元末端に有することを特徴とする特許請求の範囲第１８項記載の製造方法。

20）セファロース（登録商標）のような支持体上に好ましくは固定されたアニオン性又はカチオン性成長因子を含むクロマトグラフィーカラムの塔頂に、グリコサミノグリカン調製物を入れ、該カラムは、NaCℓ　０．２Mの濃度に対応するイオン強度の衝撃液によって平衡させたことと、NaCℓ　１M～２Mの濃度に対応するイオン強度に該緩衝液を調節することによって、該カラム上に保持された少糖類のフラクションを溶離することとを特徴とする特許請求の範囲第１６～１９項の一に記載の製造方法。

21）成長因子に対するアフィニティクロマトグラフィの作用を、グリコサミノグリカン出発調製物のゲル濾過とアルコール溶剤特にエタノールによる沈殿とによって得られるような、分子量について均質なグリコサミノグリカンフラクションに対して実現させることを特徴とする特許請求の範囲第１６～２０項の一に記載の製造方法。

22）特許請求の範囲第１６項によるグリコサミノグリカン出発調製物を、第４アンモニウムのような強塩基性アニオン交換カラムによるイオン交換クロマトグラフィに付し、NaCℓ緩衝液のイオン強度の０．５±０．１M～１－２Mの変動に対応する勾配に従って溶離緩衝液のイオン強度を変化させ、最も強アニオンのフラクションを回収することを特徴とする特許請求の範囲第１～１５項の一に記載の少糖類の製造方法。

23）グリコサミノグリカン出発調製物が、ヘパリンの解重合及びそれに続くアルコール分別特にエタノール分別によって抗トロンビン活性を示

す鎖と示さない鎖とに分離することによって得た調製物であることを特徴とする特許請求の範囲第16～22項の一に記載の製造方法。

24）特許請求の範囲第1～15項のいずれか1項記載の少くとも一の少糖類の有効量を薬学的な基剤と組合せて有効成分中に含むことを特徴とする医薬組成物。

25）ヘパリン認識細胞成長因子に少糖類が組合されたことを特徴とする特許請求の範囲第24項記載の医薬組成物。

26）ヘパリン認識細胞成長因子と別に、しかしこれと同時に少糖類を利用することを特徴とする特許請求の範囲第24項記載の医薬組成物。

27）ゼラチンカプセル、錠剤、トローチ、丸剤、リポソーム又はドリンクの形態にあり、1投与単位について有効成分を50mg～5g、好ましくは、ゼラチンカプセル、錠剤及び丸剤の場合に50～250mgを含有することを特徴とする特許請求の範囲第24～26項の一に記載の医薬組成物。

28）無水物であり、カチオン性もしくはアニオン性細胞成長因子を含有し、この成長因子は、凍結乾燥され、2～100μg、好ましくは25～100μgの割合で存在することを特徴とする特許請求の範囲第24～27項の一に記載の医薬組成物。

29）注射用溶液であり、この溶液は、10～250mg/ml、好ましくは10～100mg/mlのグリコサミノグリカンを含有し、例えば皮下注射用の場合は、150mg/mlのグリコサミノグリカンを含有し、静脈注射又は灌流用の場合は、10～500mg特に150mg/mlのグリコサミノグリカンを含有することを特徴とする特許請求の範囲第24～27項の一に記載の医薬組成物。

30）スプレー、ポマード、クリームもしくはエーロゾルとして存在し、0.5～10%のオーダーの濃度でグルコサミノグリカンを含有することを特徴とする特許請求の範囲第24～26項の一に記載の医薬組成物。

31）特許請求の範囲第1～15項の一に記載

の少糖類を含有することを特徴とする培養中の細胞の成長調整剤。

32）特許請求の範囲第1～15%項の一に記載の少糖類から作製されることを特徴とする生物学的薬剤。

3．発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、細胞の分割及び分化に対する活性を示すヘパリン型（ヘパリン又は硫酸ヘパラン型）の少糖類、その製造並びに治療へのその応用に関する。

〔従来の技術〕

ヘパリンは、周知のように、硫酸ヘパランと同様に、高度に異質のグリコサミノグルカンである。グリコサミノグリカンは、糖単位即ちD－グルコサミン構造単位－ウロン酸（L－イズロン酸又はD－グルクロン酸）構造単位の、又はその逆の交番によって形成される。この基本構造物は、二糖類単位〔D－グルコサミン〕－〔L－イズロン酸〕の連鎖を有する規則的なものでも、不

規則なものでもよく、ウロン酸単位はL－イズロン酸でもD－グルクロン酸でもよい。

鎖の分子量は、相当程度変化してもよく、約2000～50000であってよい。更に、イオン電荷は、同じ構造物の単位ついて、サルフェート基の含量に従って変化する。

この異質な性質により、含まれる連鎖に従って鎖の性状が変化する。

周知のように、ヘパリン鎖の約⅓は、ATIII（アンチトロンビンIII）結合サイトを有している。これらの鎖は血液凝固の或る因子に対して比較的特異な活性を備えている。

ATIIIに対する結合サイトのないヘパリン鎖の約⅔は、反対に、このサイトを働かせる抗凝固活性を備えていない。

ヘパリンに対する或る細胞成長因子の親和性も報告されている。この親和性は、ヘパリン－セファロース、（登録商標）カラムのアフィニティクロマトグラフィによてって細胞成長因子を精製するために利用される。

へパリンに親和性を示す細胞成長因子は、分子量が約12000～20000のアニオン性もしくはカチオン性ポリペプチドであり、細胞生理学的において重要な役割を果たしている。即ち、これらの因子は、細胞の分割及び分化に対する活性を備えている。この活性は特に、或る種の細胞、例えばフィブロブラスチン細胞、毛細血管内皮細胞及び或る筋肉細胞に対して発現される。細胞成長因子は、神経細胞の分化にも関与する。

この因子は、FGF（'fibroblastic growth factor'、フィブロブラスチン成長因子の略語）又はECGF（'endothelial cell growth factor'、内皮細胞成長因子の略語）とも表示される（「生化学(Biochimie)」1984、第66巻、419～428頁に掲載されたJ．コーティ(Courty)、Y．クールトワ(Courtois)及びD．バリトー(Barritault)の論文、並びに、「生物化学(Biochemistry)」第23巻、26号、1984年、6295～6299頁に掲載されたロイ・

R．ロブ(Roy R. Lobb)及びジェームズ・W．フェット(James W. Fett)の論文参照）。

本明細書において「少糖類又はグリコサミノグリカンという用語は、グリコサミノグリカンの比較的長い鎖の解重合によって得られた自然の生成物である少糖類のフラグメントと、合成法によって得た少糖類又は多糖類の連鎖とを包括する。これらのフラグメント及び連鎖において、還元末端及び／又は非還元末端の単位は、へパリン又は硫酸へパランの自然の鎖に対応する単位に対して化学的に変性されていてもよい。しかしこれらの変性された単位も、本明細書では、糖単位又は少糖類の単位と呼ばれている。

本発明者らは、前記の成長因子が、驚くべきことに、少糖類の或る鎖に対してしか顕著な親和性を示さないことを見出した。これらの鎖の分離に関するこの親和性の研究によって、分子量について同質の少糖類の部属が電荷の異なった多くのアニオン種の混合物であることと、最も強アニオン性の種が細胞の分割及び分化に規則的な作用

を示し、これが薬学上の利用にとって非常に好ましいことが見出された。

［発明の目的］

従って、本発明の目的は、へパリンに固着可能な細胞成長因子に対して顕著な親和性を示すへパリン型又は硫酸へパラン型の少糖類を提供することにある。

本発明の別の目的は、これらの少糖類の調製方法を提供することにある。

本発明の更に別の目的は、これらの少糖類を利用して、細胞の分割及び分化に対して活性を示す医薬品を調製することにある。

［発明の概要］

本発明による少糖類は、基本的に、鎖によって形成された生成物であり、へパリンを認識するカチオン性又はアニオン性の細胞因子に対して特異的な親和性を示し、第1図に示したRMNスペクトルの特徴を表わす強アニオン性を示し、天然へパリンに存在するものに対応した少くとも5つの単位の連鎖を含む生成物並びに医薬として認容可

能なその塩から成る。

本発明は、次式Ⅰ：

$$-(G-H)_n-G- \text{又は} -H-(G-H)_n \qquad (\mathrm{I})$$

で示される構造の糖類の単位の連鎖を有する、

式中、nは2～6の数を表し、

G−Hは、（イズロン酸・2−O−サルフェート）−（D−グルコサミン・NH−サルフェート6−O−サルフェート）の構造の二糖類の鎖状構造に対応し

Gは、L−イズロン酸・2−サルフェートの構造の単位を表わし、

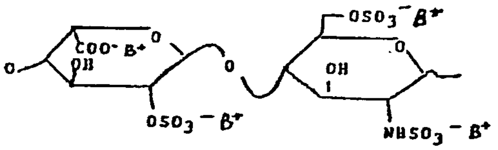
Hは、D−グルコサミン・NH−サルフェート・6−O−サルフェートの構造の単位を表わし、

へパリンを認識するカチオン性又はアニオン性の細胞成長因子に対して特異的な親和性を示す、基本的に鎖から成る生成物と、医薬として認容可能なその塩を対象とする。

これらのグリコサミノグリカンは、ATⅢ結合サイトをもたないことによって、凝固のシステ

ムに対する活性を介在させることなく、細胞の分裂及び分化の機構に対して活性を示すため、有利となる。

二糖類の連鎖ＧＨは、特に、次式II：



（II）

（ここにＢ⁺は、薬理学的に認容可能な塩を与える無機もしくは有機カチオンを表わす）

に対応している。

本発明による少糖類は、有利には、次式（III）

$$R(GH)_nR' \quad (III)$$

（式においてＲは、水素原子を表わすか、又は、Ｇ－Ｈ型の二糖類の単位を表わし、ここに単位Ｇは、ヘパリン鎖に対応する単位に対して必要により化学的に変性されており、

R'は、水素原子を表わすか、又は、Ｇ－Ｈ型の二糖類の単位を表わし、ここに単位Ｈは、ヘパリン鎖に対応する単位に対して、必要により化学的に変性されており、

ここに、Ｒ及びR'は、変性された単位を含めた少糖類の糖単位の全数が多くとも１４に等しくなるような意味を有するものとする）

に対応している。

上式（III）の少糖類の基において、非還元末端及び還元末端は、変更を受けない糖単位、即ち１位の不斉炭素又は４位にそれぞれ－ＯＨ基を有する糖単位によって形成される。

少糖類は、別の基のところに、Ｄ－グルコサミン酸又はＬ－イズロン酸の単位と異なった基を、非還元末端及び／又は還元末端に有している。

この単位は、特定的には、ヘパリン鎖の対応する単位に対して変更された糖単位である。

普通に使用されるヘパリンの解重合剤即ち硝酸もしくはヘパリナーゼに留意して、還元末端の単位は、有利には２，５－無水マンニトールもしくは２，５－無水マンノン酸の構造の２，５－マンノ構造の単位であり、非還元末端の単位は、α，β－エチレン不飽和ウロン単位である。

しかし、当業者には明らかなように、前述した糖類の連鎖の治療効果を変更しない限り、種々の有機基を合成法によって導入することができる。

本発明の特に好ましい構成によれば、少糖類は、その重合度、即ち、その鎖を形成する単位の数について均質である。

特に有利な少糖類は、六糖類である。

この六糖類は、「Ｌ－イズロン酸・２－Ｏ－サルフェート］－［Ｄ－グルコサミン－ＮＨ－サルフェート、６－Ｏ－サルフェート］の３つの二糖類の構造単位の繰返しによって形成される。これは、式（III）においてＲ、R'が共に水素原子を表わし、ｎが３に等しい場合の生成物である。

変形として、非還元末端及び／又は還元末端の単位は、ヘパリン中に存在する対応の単位に対して化学的に変性されていてもよい。対応する六糖類は、Ｒ及び／又はR'が変性された糖単位を表わす式IIIによって示される。

本発明の好ましい実施態様による六糖類は、０．５Ｎ　ＮａＣℓ緩衝液（pH、６．０）によって平衡させたアガロース－アクリルアミド４５ℓを含有する１００cm×２５cmのカラム上においてヘパリンの硝酸解重合混合物のアルコール沈殿によって得た沈殿物６０ｇを、０．５Ｍ　ＮａＣℓ５００mℓ溶液中に装入し、１時間１５００mℓの流量で溶離を行なって、ゲル沪過系中３２ℓ～３６ℓの容積の間に溶離させたフラクションに対応するフラクション中に含まれる生成物に対応している。

この生成物は、トリスＨＣℓ、０．０１Ｍ、pH７．４、０．２Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液によって平衡された、ＦＧＦアニオン－セファロース（登録商標）３０mℓを含有する２．５cm×６．５cmのカラムを使用し、このカラム上に、前記と同じ緩衝

液６０ml中に溶解させた前記フラクション３００mgを施し、１Ｍ　ＮａＣℓに調節した緩衝液を用いて溶離し、エタノールを用いて回収した該フラクションの少糖類を沈殿させてＦＧＦアニオンセファロース（登録商標）上にアフィニティクロマトグラフィによって分離したものである。

別の有利な少糖類は、八糖類であり、これは、特に、前記六糖類の鎖を含む八糖類である。八糖類は、ヘパリン中に含まれる対応する構造に対して、変性されていない単位によって形成されるか、又は、六糖類について前述したように、還元末端及び／又は非還元末端に、変性された単位を備えている。

本発明の別の態様によれば、八糖類は、

０．５Ｎ　ＮａＣℓ緩衝液（pH ６．０）によって平衡させたアガロース－アクリルアミド４５ℓを含有する１００cm×２５cmのカラム上においてヘパリンの硝酸解重合混合物のアルコール沈殿によって得た沈殿物６０ｇを、０．５Ｍ　ＮａＣℓ　５００ml溶液中に溶かし、１時間

１５００mlの流量で溶離を行なって、ゲルが濾過系２８ℓ～３２ℓの容積の間に溶離させたフラクションに対応するフラクション中に含まれる生成物に対応している。

この生成物は、トリス－ＨＣℓ０．０１Ｍ、pH７．４、０．２Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液によって平衡された、ＦＧＦアニオン－セファロース（登録商標）３０mlを含有する２．５cm×６．５cmのカラムを使用し、このカラム上に、前記と同じ緩衝液６０ml中に溶解させた前記フラクション３００mgを施し、１Ｍ　ＮａＣℓに調節した緩衝液を用いて溶離し、エタノールを用いて回収した該フラクションの少糖類を沈殿させてＦＧＦアニオンセファロース（登録商標）上にアフィニティクロマトグラフィーによって分離したものである。

別の有利な少糖類は、還元末端又は非還元末端の変えられた単位が化学的に変性されている十糖類によって形成される。

これらの十糖類は、八糖類を取得するための

前記のゲル沪過系においての２５ℓ－２８ℓの溶離容積に対応するフラクションに含まれ、八糖類のための前記の条件の下にＦＧＦ－アニオン－セファロース（登録商標）によってアフィニティクロマトグラフィによって分離されたことを特徴とする。

前記のように末端が必要に応じて化学的に変性された１２糖単位を含む鎖によって形成された少糖類も同様に生成物として好ましい。

本発明による少糖類は、薬理学的に認容可能な塩の形としてもよい。これには、カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩及びマグネシウム塩が含まれる。

本発明は、以上に述べた少糖類の製造方法も提供する。

この方法は、所定のイオン強度をもった緩衝液を使用して、ヘパリン又は硫酸ヘパラン型グリコサミングリカン調製物を、有利には支持体上に固定させたアニオン性もしくはカチオン性成長因子と接触させ、該成長因子に対して親和性を示さない鎖又は中庸の親和性を示す鎖を除去し、次に、該成長因子上に固定された糖類の鎖を回収することを特徴とする。

この構成によれば、強アニオン性の鎖を混合物から分離することができる。

ＡＴⅢに対する結合サイトを有するフラグメント又は鎖が基本的に除去されたグリコサミノグリカン出発調製物が使用される。この調製物は、天然のヘパリンもしくは硫酸ヘパランの鎖の混合物、ヘパリンもしくは硫酸ヘパランのこれらの鎖の解重合フラグメント又は多くとも１４単位を含むフラグメントもしくは鎖の混合物によって形成される。

グリコサミノグリカン調製物と細胞成長因子との接触は、緩衝液によって平衡させたアニオン性もしくはカチオン性成長因子を含有したクロマトグラフィカラム中において行わせることが好ましい。細胞成長因子は有利には支持体に固定させる。適切な支持体は、多糖類特にアガロースを主成分とするものである。この用途にとって有利

な支持体は、セファロース（登録商標名）の下に市販されているアガロースのゲルによって形成される。分枝を有するポリスチレンによって例えば形成された血液と適合性のマトリックス、例えば、フランス原子力エネルギー委員会のフランス特許第２５３４４８６号（特許日、１９８２年１０月１５日）、コアイ(CHOAY) Ｓ．Ａ．及びＣ．Ｎ．Ｔ．Ｓのフランス特許第２５５３５１８号（特許日、１９８３年１０月１３日）に記載された支持体を用いてもよい。

満足な分離は、ＮａＣℓ　０．２Ｍの濃度に対応するイオン強度の緩衝液中において平衡させ、アニオン性又はカチオン性の細胞成長因子をその上に固着させた、予め調製したマトリックス上に、グリコサミノグリカン調製物を通過させ、次に、ＮａＣℓ　１Ｍ～２Ｍの濃度に対応するイオン強度に緩衝液を調節して、カラム上に保持された少糖類のフラクションを溶離することによって行なう。

本発明の好ましい実施例によれば、細胞成長

因子に対するアフィニティクロマトグラフィの作用は、所定の特性のグリコサミノグリカン型を所定のフラクションから分離するために、分子量について均質なグリコサミノグリカンのフラクションについて行われる。

この種のグリコサミノグリカンのフラクションは、有利には、前記のグリコサミノグリカン調製物をゲル沪過操作にかけることによって取得される。

ゲルカラムの塔頂に供給される混合物を適当な緩衝液を用いた溶離によって、分子量の関数として、順次に、均質な少糖類のフラクションを回収する。この形式の操作において従来から使用されたゲル、例えばアガロース－アクリルアミド型のゲルを使用することができる。

これらのフラクションをうまく分離するには、ほぼ０．５ＭのＮａＣℓ緩衝液のイオン強度に相当するイオン強度を有する緩衝液を用いた溶離による。

所望のグリコサミノグリカンフラクションに

対応するカラムからの溶出液を回収し、アルコール系溶剤、特にエタノールによって無機塩の添加の後に、フラクションを沈澱させる。鎖の分子量について均質な、回収されたフラクションは、イオン電荷については、対照的に、非常に不均一である。

鎖混合物（分別された後成長因子に対する親和性によって分離されるか又は分別を行うことなく成長因子によって直接分離される）によって形成されるグリコサミノグリカン調製物は、より特定的には、ヘパリンの解重合の後、ＡＴⅢに対する結合サイトを有する鎖をこのサイトを有しない鎖から分離するために分別を行なうことによって取得される。

既知の解重合法は、ヘパリンに対する硝酸、ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼ又は過沃素酸塩の作用に特に基づいており、硝酸又は過沃素酸塩による解重合は、産業上の利用の観点から特に有用である。使用するヘパリンは、粗ヘパリン又は医薬グレードのヘパリンである。

使用する解重合フラクションは、ヘパリンに見られる対応する構造に対して変性された単位を非還元末端及び還元末端に備えていてもよい。これは、ヘパリナーゼもしくはヘパリチナーゼを用いた解重合又はα，β除去の場合は、α－β不飽和ウロン単位であり、硝酸を用いた解重合の場合には、２，５－無水マンノ構造単位である。

硝酸を用いる好ましい硝酸による解重合技法は、本出願人のフランス特許第２５０３７１４号（特許日、１９８１年４月１０日）の対象となっている。このフランス特許の方法によれば、所望の解重合度が達せられた時に全部の硝酸イオンが消費されるようなそれぞれの濃度に従って水性媒質中においてヘパリンと硝酸とを反応させる。

硝酸の脱アミノ化の終了時に得られる２，５無水マンノース構造の還元基は、水素化硼素ナトリウムのような還元剤によって、２，５－無水マンニトール構造の基に還元されるか、又は、過

マンガン酸塩特に過マンガン酸カリウムのような酸化剤によって、２，５－無水マンノン酸構造の基に酸化される。

ＡＴⅢに対する親和性の鎖と非親和性の鎖との分別は、有利には、無機塩の存在の下にアルコール特にエタノールで分別することによって行われ、その結果として、

－ヘパリンの１０、１２、１４、１６、１８糖単位に主として対応する大きさのフラグメントから成るサブユニット（このサブユニットは、アンチトロンビンⅢとの結合の五糖類単位を有し、強い抗因子Ｘａ活性と微弱な総体的な抗凝固活性とを示す）と、

－ヘパリンの２、４、６、８、１０糖単位に主に対応する大きさのフラグメントからなるサブユニット（このサブユニットは、総体的な抗凝固活性をほとんど示さず、抗因子Ｘａ活性は非常にわずかである）とが生ずる。

変形例によれば、本発明によるグリコサミノグリカンは、溶離用緩衝液のイオン強度を適切な

勾配に従って変えることによって、第四級アンモニウムのような強塩基性のアニオン交換体によるイオン交換によって取得される。

０．５Ｍ±０．１Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液と１～２Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液とのイオン強度にそれぞれ対応するイオン強度を有する平衡－洗浄緩衝液と溶離緩衝液とを使用することによって、所望の親和性の鎖が混合物から満足のゆくように分離される。

前記の強アニオン性のグリコサミノグリカンの糖類の鎖の満足な分離は、ＮａＣℓ　０．４Ｍの濃度に対応する値から１Ｍの濃度に対応する値まで平衡化緩衝液のイオン強度を変えることによって達せられ、この勾配は、分離しようとするグリコサミノグリカンの形式、特に、その鎖の長さに適合される。

本発明のグリコサミノグリカンの薬理学的な研究によって、細胞の分裂及び分化に対するこのものの性状が明らかにされた。

周知のように、ヘパリンに対する親和性をもっ

た細胞の成長因子は、特に、種々の細胞形成において見出される種々の細胞レセプター上に固定されることによって作用する。

本発明者が確めたところによると、本発明によるグリコサミノグリカンは、これらの成長因子の活性を変更する。

或る細胞は、［スポーン(Sporn) M.B.，トダロ(Todaro) G.J. New Engl. J. Med. 303，878-880，1980によって定義された］オートクリン(autocrin)であり、成長因子を付加することなく細胞の分裂と分化とに対する本発明のグリコサミノグリカンの（特に考えている細胞の分化の状態及び表現型に従って）、変調の、即ち活性化又は禁止のポテンシャルを発現させる。

ヒトのへそ静脈、ウシ及びマウスの内皮細胞の培養基を用いた特別の実験モデルによって試験を行なった。これらの試験によって、グリコサミノグリカンを有しない対照培養基又はアニオン性ＦＧＦに対する親和性を示さない基準六糖類に対する細胞の増殖の変調が示された。

ヘパリンのフラグメントの存在下において或るステロイドが新しい血管形成を禁止する役割を示すことも知られている。コルチコイドと共に投与される本発明のグリコサミノグリカンは、Ｊ．フォルクマン等が「サイエンス(Science)」２２１，７１９（１９８３）に発表しているようなヒナの漿尿膜の実験モデルにおいて、この種の作用を有利に示した。

この有用な性質にはすぐれた無毒性が付随する。

従って、本発明は、グリコサミノグリカンを内皮細胞の増殖の調整剤として利用することを提案する。この調整剤は、新しい血管形成が病的である過程においては禁止剤として少量使用され、成長因子の保護が必要とされるか又は再生が望まれる或る過程においては成長促進剤として多量に使用される。

病的な新しい血管形成過程の例としては、糖尿病の網膜病、転移の経過、乾癬などがある。

本発明の生成物は、胚子の増殖を禁止するた

めにも利用しうる。

内皮の損傷の場合又は循環性障害例えば潰瘍をひき起こす壊死の場合に、再生を刺激するために、本発明の生成物を使用してもよい。創傷性もしくは先天性の損傷のために、又は、後天性の変性病態特に血管性の事故例えば梗塞の後の心臓組織の障害に対して本発明の生成物を使用してもよい。

本発明は、前記の少くとも1種のグリコサミノグリカンの有効量を薬理学的な基剤と共にその有効成分中に含有する薬理学的組成物も提供する。

有利な薬理学的組成物は、有利には、前述の高アニオン化度の六糖類、又は八糖類、十糖類又は十二糖類、又はその混合物を、その薬理学的に認容可能な塩の形で含有する。

この医薬の有効成分は、グリコサミノグリカンを単独もしくは、変形として、ヘパリンに対する親和性を示す細胞成長因子との組合せとして含有する。別の変形として、グリコサミノグリカンと

成長因子とは、予め結合させることなく、同時に使用される。

本発明のグリコサミノグリカンの別の有利な使用態様によれば、ステロイドとの組合せとして、グリコサミノグリカンを使用する。

この医薬組成物は、細胞の分裂及び分化に対するその性状に留意して、主に次の治療上の指示として主に使用することができる。

一特に創傷性又は先天性の障害の後の筋肉組織、血管性の障害例えば梗塞の後の心臓組織、並びに、特に創傷性の障害の後の皮膚組織の修復の刺激。

一創傷性の障害の後の瘢痕化の促進。

一糖尿病の網膜症、腫瘍の増殖、乾癬のように、新しい血管の形成が病的である過程の、単独での、又はステロイドとの組合せによる抑止。

本発明による薬理学的組成物は、いろいろな形態で投与することができる。

グリコサミノグリカンが単独で有効成分の構

成に用いられる場合には、これらの薬理学的形態は、水和物であってもよく、有効成分が成長因子を含む場合には無水物であってもよい。有効成分は、投与単位について1～200μg、有利には25～100μgの割合で存在させる。

経口投与の場合には、特にゼラチンカプセル、錠剤、トローチ剤、丸剤、リポソームを使用する。これらの調製物は、有利には、1投与単位当り50mg～5g、好ましくは、ゼラチンカプセル、錠剤及び丸剤の場合には、50～250mgを含有している。

本発明の他の投与形態は、スプレー、ポマード、クリーム又はエーロゾルによって形成され、有効成分の濃度は、0.5～10%のオーダーである。

有利には、本発明の生成物は、無菌の溶液又は無菌とすることの可能な溶液中の静脈、皮膚又は筋肉を経て注射しうる薬理学的組成物の形で投与される。

有利には、本発明による生成物は、特に外用

薬として使用する調製物において成長因子との組合せにおいて使用される。

静脈、皮膚又は筋肉を経て注入するために使用される溶液は、それが皮下注射に用いられる場合、好ましくは、10～250mg/mℓ、好ましくは10～100mg/mℓ例えば100mg/mℓのグリコサミノグリカン組成物を含有している。この溶液は、静脈注射される場合又は灌流によって投与される場合は、例えば10mg～500mg、特に150mg/mℓのグリコサミノグリカンを含有していてもよい。

前記の医薬調製物は、有利には、いつでも使用できる状態とした、使い捨て注射器に入れて供給してもよい。

以下に、ヒトに対して適用しうる用量例について説明する。これは、1日に30～500mgを1回又は何回かで皮下注射又は静脈注射によって患者に投与する場合の例である。灌流によって投与可能な量を数10mℓとしうることから、静脈注射によって、1日約150mgを注射する。この投

与は一定の時間間隔で不連続的に行なってもよいが、滴液によって連続的に行なうこともできる。この投与量は、予め行う分析の結果と患者の疾病の状態と一般的な患者の健康状態との関数として、各々の患者について調節されることは言うまでもない。

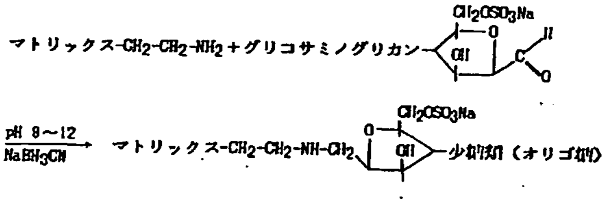
以上に説明した医薬組成物は、患者にとって受入れ可能な量に従って、ステロイド型の化合物を含有していてもよい。

特に、ステロイドの量は、患者に対する投与量が１日当り５mg/kgを超過しないようにすることができる。

別の組成物においては、この用量は過大である。しかしこの用量は、そのホルモン活性を失ったステロイド誘導体の場合には高くすることができる。

本発明は、前述したグリコサミノグリカン組成物によってその有効成分が形成される生物学的な薬剤にも関する。これらの生物学的薬剤は、前記の例において説明した技法を使用する試験において、特に、他の物質の抗腫瘍性を研究するための基準として使用することができる。

本発明によるグリコサミノグリカンは、分離を可能とするためのアフィニティクロマトグラフィの支持体を与えるように、常法に従って、不溶性ゲル又は慣用される他の不溶性支持体もしくはマトリックスに固定させることができる。適切な支持体としては、セファロース（登録商標）の下に市販されている多糖類特にアガロースと、一般的に、アミノエチルセルロース、アミノエチルポリアクリルアミドもしくはアミノエチルアガロースのようなアミノエチル分枝を有する不溶性－親水性の支持体とが例示される。グリコサミノグリカンは、次の反応式



に従って、シアノ水素化硼素ナトリウムの存在下に、例えば塩基性水性媒体中において縮合により前記の支持体上に固定される。

このようにして取得されたマトリックスは、カラム中に仕込まれる。

前記の支持体又はマトリックス上に固定させた本発明によるグリコサミノグリカンをアニオン性もしくはカチオン性細胞成長因子と接触させることにより、細胞成長因子を選択的に再保持することを可能とする手段が得られる。この固定されたグリコサミノグリカンは、細胞成長因子を精製するか、もしくは、所定の媒質中のこれらの因子の濃度を低減させるための配位子として使用することができる。

成長因子の分離は、有利には、次のようにして行なわれる。

－再保持すべき細胞成長因子を含有する溶液、又は粗抽出物は、０．１～０．６Ｍ　ＮａＣℓのイオン強度の低い緩衝液中において、pHが中性まで、カラムによってパーコレートされる。溶出液中に蛋白質がなくなるまで、同じ緩衝液によってカラムを洗浄する。マトリックス上に保持した細胞成長因子は、イオン強度が０．８～２Ｍ　ＮａＣℓのpH中性の緩衝液によって直接に、又は、０．８Ｍ～２Ｍ　ＮａＣℓの連続した勾配のイオン強度によって溶離される。

成長因子は、直接に、生物学的環境から、又は、予め精製操作に付した調製物から由来させることができる。

本発明のその他の特徴及び利点は、種々のグリコサミノグリカンの調製及び薬理学的な試験の成果についての以下の詳細な説明によって一層明らかとなろう。

<u>実施例　１</u>

Ａ　<u>解重合</u>

ナトリウム塩型の注射可能なヘパリン５００ｇを温度１８℃（濃度約１１容量％）で、純水４５００mℓ中に溶解させた。

得られた溶液を強くかき混ぜ、濃塩酸を添加して、pHを２．５に降下させた。水３００mℓ中に

溶解させた亜硝酸ナトリウム１５ｇを添加した（最終的に０．０４３Ｍとする適量）。反応のpHを濃塩酸の添加によって２．５に調節し、溶液の全容積は、ヘパリンの濃度が１０容量％となるように、５０００mlとした。４５分間反応を行わせた。この時間が経過した後、反応溶液中に残留する硝酸イオンの不在をアミド化沃化カリ含浸指示紙によって確認した（ＮＯ₂⁻イオンの存在で青ー紫色に発色する）。

硝酸イオンが検出された場合、指示紙上の反応がなくなってイオンが全く消失するまで反応を継続した。３～４分おきに検査を行なった。

検査の結果が陰性になったら、反応は終了したものとした。濃ソーダによって溶液の濃度を１０に高めた後、水素化ホウ素ナトリウム５ｇを添加した。

１５時間溶液をかき混ぜないで保持した。

未反応の水素化ホウ素ナトリウムは、濃塩酸によってpHを３．０に低下させることによって分解した。１５分間溶液をかき混ぜ状態に保持した後、濃ソーダによってpHを７．０に再調節した。

反応生成物を回収するために、エタノール１０ℓを添加し、４８時間放置し、混合物を傾瀉し、上澄み液を除去した。

Ｂ　分別

沈殿物を、純水９ℓ中に再溶解させた（ヘパリン出発物質の重量基準で濃度５容量％）。塩化ナトリウム１００ｇを添加し、濃塩酸によって、溶液のpHを３．８に降下させた。純水によって容積を正確に１０ℓに調節し、エタノール１０ℓを強くかき混ぜつつ添加した。４８時間放置し、上澄み液をサイホン作用によって除去し、５Ｎソーダによって pHを７．０に調節した。エタノール１９ℓを添加し、更に４８時間放置した。上澄み液をサイホン作用によって分離し、沈殿物を回収し、エタノールで洗浄し、破砕し、真空乾燥した。これによって少糖類の混合物１２０ｇが得られた。

Ｃ　ゲルー沪過

得られた混合物６０ｇを０．５Ｍ　ＮａＣℓ５００mlに溶解させ、ウルトロゲル（Ultrogel）ＡｃＡ２０２（登録商標）のカラムの塔頂に施した。０．５Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液によって、１時間１５００mlの流量でカラムを溶離処理した。

溶出液のＵＶ吸収２１４ｎｍが連続的に記録された。第２図に示した溶離プロフィルが得られた。７フラクションを分離し、エタノール２容積によって沈殿させた。

これらのフラクションの特性は次の通りであった。

フラクション番号	1	2	3	4	5	6	7
体積（リットル）	2.1	2.2	4.1	3.8	3.3	2.5	1.8
溶出液の体積の範囲（リットル）	41−39	39−36	36−32	32−28	28−25	25−22	22−20
生成物の乾燥重量*	1.2g	5.6g	12g	8.8g	8g	6.2g	1.5g
性質	二糖	四糖	六糖	八糖	十糖	十二糖	十四糖

*アルコール沈殿によって得た生成物は、遠心分離し、30分間80℃で真空乾燥に付した。

六糖類のフラクションのイオン交換の溶離プロフィルを第3図に示す。この第3図において、保持時間は横軸に、溶出液中の生成物の量は縦軸に、それぞれプロットされている。この測定には、NaCl勾配が0.5～1.5M、流量1ml/分の、ファルマシア社製のカラムモノ－Q（登録商標）を使用した。波長210nmにおける吸収によって検出を行なった。この溶離プロフィルのチェックによって、フラクションの異質性が示された。

D　－FGF－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィ

ロイ（Roy）R．ロッブ（Lobb）及びジェームズ（James）・W．フェット（Fett）、生化学（Biochemistry）第23巻、26号、1984、p6295～6299の方法に従って、ウシの脳提からアニオン性FGFを調製した。

セファロース4B（登録商標）30ml上にアニオン性FGF45mgを、P．M．カトリカサ（Cuatrecasas）、M．ウイルチェック（Wilchek）及びC．B．アンフィンセン（Anfinsen）、「プロク．ナショナル．アカデミーサイエンス（Proc. Nat. Acad. Sci.）」、U．S．61（1968）、636の方法に従って固定させた。

このようにして取得したFGF－セファロース（登録商標）をカラム（2．5cm×6．5cm）に装入し、トリスHCl0．01M　pH7．4、0．2M　NaCl緩衝液（以下緩衝液Ⅰと呼ぶ）中において平衡化させた。

緩衝液Ⅰ60ml中に溶解させた六糖類フラクション300mgを、FGFセファロース（登録商標）のカラムに施し、このFGFセファロースを、1時間60mlの流量で、緩衝液Ⅰ600mlで洗浄した。1M　NaClに調節した緩衝液Ⅰによってカラムを最終的に溶離処理した。少糖類物質を含有する溶出液18mlを回収し、純エタノール108mlを添加して沈殿させた。第4図に示したイオン交換の溶離プロフィルを有する六糖類0．15mgをこのようにして回収した。この生成物は、以下の説明において、IC1698と呼ばれている。

第1図の六糖類の^{13}CのRMN（核磁気共鳴吸収）スペクトルの特性を以下に示す。なお、6つの構成単位を示すために、次の記号G_1　H_1　G_2　H_2　G_3　AM_3が用いられている。

この生成物の重水中溶液中においてスペクトルを測定した（25MHz）、シフトを測定するための基準：3－（トリメチルシリル）プロピオン酸ナトリウムのTST塩。

ppm	標識	属性	より一般的な属性*
60.5	5	H_1 +H_2 のC-2	N-サルフェートグルコサミン基のC-2
63.3	9	AM_3 のC-1	無水マンニトール基のC-1
68.9	11	H_1 +H_2 のC-6	グルコサミンN-サルフェート-6- サルフェートのC-6
70.7	13	AM_3 のC-6	無水マンニトール6-サルフェート基のC-6
77.8	17	AM_3 のC-3	無水マンニトール基のC-3
82.0	19	AM_3 のC-5	無水マンニトール基のC-5
85.8	21	AM_3 のC-2	無水マンニトール基のC-2
87.5	23	AM_3 のC-4	無水マンニトール基のC-4
98.6			
99.2	27	H_1 +H_2 のC-1	グルコサミン-N- サルフェート基のC-1
102.6			
101.8			
101.6	29	G_1 +G_2 +G_3 のC-1	イズロン-2- サルフェート基のC-1

*ヘパリンについてのこの分野においての知識に対するもの

実施例　2

注射可能なヘパリンの別のロットを使用して、実施例１と同様に操作した。

少糖類混合物１１５ｇが最終的に得られた。実施例１と同様の条件の下に、ゲル－沪過によって、この混合物６０ｇを処理した。

回収したフラクションの特性を次表に示す。

フラクション番号	1	2	3	4	5	6	7
体積（リットル）	2.2	2.2	3.1	2.0	3.4	3.1	2
生成物の乾燥重量	4.8g	1.9g	11.8g	1.7g	10.2g	7.9g	6.0g
性質	四糖	中間的四糖	六糖	中間的八糖	八糖	十糖	十二糖

フラクション２（中間四～六糖類）３００mgをＦＧＦセファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィにかけた。生成物ＩＣ１９６７　０．１１mgが最終的に得られた。

六糖類フラクション３００mgをＦＧＦ－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィにかけた。第４図に示したものに対応するイオン交換勾配の溶離プロフィルを有する生成物０．２２mgがこのようにして得られた。

実施例　3

六糖類のフラクション３の１．５ｇを、０．４Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液によって平衡させたセファロース（登録商標）のアニオン交換カラム（１７０mℓ、２．５×３５cm）に施した。

溶出液中の少糖類物質が消失するまで、０．６Ｍ緩衝液によってカラムを洗浄した（洗浄量、３．５ℓ）。洗浄の際に回収された、吸着されなかった少糖類は、アニオンＦＧＦに対する親和力のない生成物に対応するものであった（以下Ｐ３８ＥＸＨ１３と呼ばれる）。

次にカラムを１Ｍ　ＮａＣℓ緩衝液によって溶出処理し、少糖類を含有する溶出液１２０mℓを回収し、エタノール７２０mℓを添加することによって沈殿させた。

このようにして、第５図に示したものに対応するイオン交換クロマトグラフィ溶離プロフィルを有する生成物８０mgが得られた。

実施例　4

－ＦＧＦカチオン－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィによる抗アニオン性六糖類の分離方法

ウシの脳撰のカチオン性ＦＧＦの調製とこのカチオン性ＦＧＦのセファロース（登録商標）上の固定とを、アニオン性ＦＧＦについて前述した技法と同様の技法に従って行なった。

ＦＧＦカチオン－セファロース（登録商標）１０mℓを含有するカラム（１．６cm×５cm）（セファロース１mℓ当りカチオン性ＦＧＦ１．５mg）を、緩衝液Ｉによって平衡させた。

緩衝液Ｉ１２０㎖中に溶解させた六糖類１００㎎（実施例１に従って取得）を、カラムに施した。カラムを緩衝液Ｉ２００㎖によって洗浄し、２Ｍ　ＮａＣℓによって調節した緩衝液Ｉによって溶出処理した。

少糖類物質を含有する溶出液１０㎖を回収し、純エタノール５０㎖を添加して沈殿させた。

第４図に示したものに対応するイオン交換溶離プロフィルを有する六糖類０．０５０㎎が、このようにして回収された。

実施例　５

ー本発明による少糖類を含有する解重合混合物の調製の変形

過沃素酸の劣化による少糖類の調製

純水２００㎖中にヘパリン１０ｇを溶解させた。

最終モル価を０．２５Ｍとするに足る量（１０．７ｇ）のメタ過沃素酸ナトリウムを添加し、５Ｎ　ＨＣℓによって溶液のpHを３．０に降下させた。

次に溶液を４８時間暗所で２５℃で放置した。

５ＮソーダによってpHを７とし、純エタノール３００㎖を添加した。生成した沈殿物を回収し、破砕し、エタノール及びアセトンで洗浄した後、６０℃で真空乾燥した。

沈殿物を、１㎖中に水素化ホウ素ナトリウム２㎎を含有する０．２Ｎソーダ１２０㎖中に再溶解させた。周囲温度で１５時間溶液を撹拌した。５Ｎ　ＨＣℓによってpHを４に調節した後、５Ｎソーダによって更にpHを７に調節した。次に純エタノール２００㎖を添加した。

生成した沈殿物を遠心分離し、破砕し、エタノール及びアセトンで洗浄し、６０℃で真空乾燥した。

このようにして、少糖類混合物６．４ｇが得られた。この混合物を、実施例１の条件の下に、ウルトロゲルＡｃＡ２０２（登録商標）上のゲル一沪過工程にかけた。

ヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼの酵素作用による少糖類の調製

ヘパリナーゼ又はヘパリチナーゼをフラボバクテリウム・ヘパリヌム（Flavobacterium Heparinum）から抽出し、Ｐ．ホビング（HOVINGH）及びＡ．リンカー（LINKER）、J. Biol. Chem. 第４５巻、２２号、１９７０年、ｐ６１７０－６１７５に記載された技法に従って精製した。

ーヘパリナーゼによる解重合

ヘパリン１０ｇを、０．１Ｍ、pH７．０の酢酸塩と０．０１Ｍの$CaC\ell_2$との緩衝液５００㎖中に溶解させた。

この溶液を、３０℃の麦芽エキス浴中に加え、純ヘパリナーゼ２．５㎎を添加した。

２４時間３０℃でインキュベートした。純エタノール１２００㎖を添加した。

生成した沈殿物を遠心分離によって回収し、エタノールによって洗浄し、６０℃で真空乾燥した。

少糖類混合物７．１ｇが取得され、このものは、実施例１の条件の下に、最終的に、ウルトロゲルＡｃＡ２０２（登録商標）上でゲル一沪過にかけられた。

ーヘパリチナーゼによる解重合

ヘパリン１０ｇを、０．１Ｍ、pH７．０の酢酸塩及び０．０１Ｍ　$CaC\ell_2$の緩衝液５００㎖中に溶解させた。

この溶液を４０℃の麦芽エキス浴に加え、純ヘパリチナーゼ５㎎を加えた。１０時間４０℃でインキュベートした後、純ヘパリチナーゼ３㎎を加えた。更に６時間インキュベートし、更に３㎎のヘパリチナーゼを加えた。この最後の添加後１０時間してから、エタノール１２００㎖を加えて、反応生成物を沈殿させた。

生成した沈殿物を遠心分離によって回収し、エタノールで洗浄し、６０℃で真空乾燥した。

少糖類混合物６．８ｇが取得され、このものは、実施例１の条件の下において最終的にゲル沪過にかけられた。

実施例 6

－ＦＧＦ－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィによるアニオン性ＦＧＦに対する親和性の高い八糖類の調製

実施例１Ｄに記載したようにして、クロマトグラフィカラムを調製した。

実施例１のようにして得た八糖類のフラクション３００mℓを、ＦＧＦ－セファロース（登録商標）のカラムに施した。このカラムを、１時間６０mℓの流量で、緩衝液Ｉ６００mℓで洗浄した。１Ｍ　ＮａＣℓに調節した緩衝液Ｉによってカラムを最終的に溶離処理した。

少糖類物質を含有する溶出液２０mℓを回収し、純エタノール１２０mℓを添加することによって沈殿させた。第６図に示したイオン交換溶離プロフィルを有する八糖類の混合物０．２８ｇを回収した。

得られた八糖類混合物に対する２５ＭＨｚの重水中^{13}Ｃ　ＲＭＮスペクトルを第７図に示す。

実施例 7

－ＦＧＦ－セファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィによるアニオン性ＦＧＦに対する高親和性十糖類の調製

実施例１Ｄに記載したようにしてクロマトグラフィカラムを作成した。

緩衝液Ｉ６０mℓ中に溶解させた、実施例１のようにして得た十糖類フラクション３００mgを、ＦＧＦ－セファロース（登録商標）のカラムに施し、このカラムを１時間６０mℓの流量で緩衝液Ｉ６００mℓによって洗浄した。１Ｍ　ＮａＣℓに調製した緩衝液Ｉによってカラムを最終的に溶離処理した。

少糖類物質を含有する溶出液２６mℓを、純エタノール１６０mℓの添加によって回収した。第８図に示したイオン交換溶離プロフィルを有する十糖類混合物０．３８mgがこのようにして回収された。

得られた十糖類混合物についての２５MHz の重水中^{13}Ｃ　ＲＭＮスペクトルを第９図に示す。

実施例 8

－アニオン性ＦＧＦに対して親和性のグリコサミノグリカンフラグメント混合物の取得

ゲル－沪過工程Ｃを行なわないことを除いて、実施例１と同様に操作した。

前出の表に示した二糖類、四糖類、六糖類、八糖類、十糖類、十二糖類及び十四糖類を含有する混合物について、ＦＧＦセファロース（登録商標）上のアフィニティクロマトグラフィを行なった。

このクロマトグラフィ処理によって、ＦＧＦに対する親和性を備えた混合物の類を分離することができた。

実施例 9

実施例１によるヘパリンの最初の解重合の際の水素化ホウ素ナトリウムによる還元工程を行なわないことを除いて、実施例３に記載した技法に従って、六糖類１２０mgを調製した。

この六糖類１２０mgを、０．５Ｍ　ＮａＣℓ１００mℓ中に溶解させた（飽和させたマトリックス１mℓ当りアミノエチル基約８μモルを含有する）。セファロース（登録商標）－アミノエチル５０mℓとシアノ水素化ホウ素ナトリウム５０mgとを添加した。溶液のpHを５Ｎソーダによって１１に調節し、１０時間周囲温度に、緩和な撹拌下で、保持した。

次にマトリックスをブッフナー沪斗上で沪過し、０．５Ｍ　pH７　ＮａＣℓ溶液１ℓ、１０$^{-3}$Ｎ塩酸１ℓ及び１Ｍ、pH１０．０のＮａＣℓ５００mℓにてこの順序で洗浄し、最後に蒸留水１ℓにて洗浄した。

マトリックス５mℓを取出し、２Ｎ塩酸中にて１００℃３時間加水分解した。加水分解生成物中のウロン酸の量によって、最終的に得られたマトリックスがセファロース（登録商標）１mℓ当り共役結合六糖類２mgを含有していることが示された。

直径２．５cm、高さ８cmのカラムに、セファロース（登録商標）－六糖類マトリックス４０mℓを装入した。

トリスHCℓ、0.02M、pH7.0、0.3M NaCℓ緩衝液（緩衝液I）によってカラムを平衡化させた。

（R.R.ロブ（Lobb）及びJ.W.フェット（Fett）、「生化学（Biochemistry)」、第23巻、26号、1984、P6295～6299の技法に従って調製した）ウシの脳葉のアニオン性FGF2mgを、緩衝液I 10mℓ中に溶解させ、カラムを経てパーコレートさせ、次にこのカラムを同じ緩衝液I 120mℓにて洗浄した。

次に、緩衝液I 200mℓとトリス－HCℓ 0.02M、pH7.0、2M NaCℓ緩衝液200mℓとの漸進的な混合によって得られる直線的な勾配によって、カラムを溶離処理した。

アニオン性FGFのピークは、約0.7Mのイオン強度でカラムから現出され、収率95%で回収された。

実施例10

実施例1によるヘパリンの最初の解重合の際に四水素化ホウ酸塩で還元する工程を行なわない

ことを除いて、実施例7と同様の技法に従って、十糖類10mgを調製した。

この十糖類10mgを蒸留水20mgに溶解させた。（1mℓ中にアミノエチル基8μモルを含有する）セファロース（登録商標）－アミノエチル5mℓとシアノ水素化ホウ素ナトリウム5mgとを添加した。5Nソーダによって懸濁体のpHを11に調節し、1週間周囲温度に緩和な撹拌下に保持した。

次にセファロース（登録商標）のマトリックスをブッフナー漏斗上において濾過し、0.5M、pH7のNaCℓ溶液100mℓ、10^{-3}N塩酸100mℓ及び2M NaCℓ100mℓによってこの順序で洗浄し、最後に蒸留水200mℓによって洗浄した。

マトリックス1mℓを取出して2N塩酸5mℓ中にて3時間加水分解した。加水分解生成物中ウロン酸の量から、取得されたマトリックスが共役結合された十糖類をセファロース（登録商標）1mℓ中に1.8mg含有していることが示された。

直径1cm、高さ5cmのカラム中に、セファロース（登録商標）－十糖類4mℓを装入した。トリス－HCℓ 0.02M pH7.0 0.6M NaCℓ緩衝液（緩衝液II）によってカラムを平衡化させた。実施例1に示した技法と同一の技法によって調製したウシ脳葉カチオン性FGF緩衝液IIを2mℓ中に0.2mg溶解させた溶液をカラムの塔頂に施した。緩衝液II 40mℓによってカラムを洗浄した。最後に、トリスHCℓ 0.02M pH7.0、2M NaCℓ緩衝液によってカラムを最終的に溶離処理した。アニオン性FGFは、狭いピークの形で溶出された。溶出液中の検出量は、0.18mgであり、これは収率90%に相当する値であった。

実施例11

実施例1の変形例として、解重合の工程を、過沃素酸塩による酸化によって次のように行なった。

1／－過沃素酸によるヘパリン鎖の切断

コデックス(Codex) 投薬量中滴定値157u／mg、イン(Yin) 等の抗因子Xaの投薬量中滴定値155u／mgのナトリウム塩形のブロク筋肉に注入可能なヘパリン10gを4℃の純水250mℓ中に溶解させた。濃塩酸によって溶液のpHを5.0に調節した。4℃の純水250mℓ中メタ過沃素酸ナトリウム（$NaIO_4$、分子量213.89）10g溶液を、緩和な撹拌の下に添加した。濃塩酸を添加して溶液のpHを5.0に調節した。＋4℃の低温の暗室中に24時間溶液を放置した。

2／－残留過沃素酸塩の除去

3つの透析管NOJAX40（登録商標）（多孔率、3－4000Da）中に反応溶液を分配し、純水流に対して15時間透析にかけた。

3／－塩基性媒質中の解重合

透析によって得た溶液780mℓに10Nソーダ16mℓを添加し、（18～21℃程度の）周囲温度で3時間全体を撹拌した。

必要ならば、この工程に続いて還元工程を次のように行なう。

水素化ホウ素ナトリウム（$NaBH_4$、分子量37.83）500mgを次に添加し、得られた溶液を4時間周囲温度で再び攪拌する。次に濃塩酸でpHを4にする。15時間攪拌した後に濃ソーダでpHを7に調節する。

得られた溶液820mlに、NaCl 16.4gとエタノール1270mlとをこの順序で添加する。

全体を3時間静置した後2500 r.p.m. で20分間遠心分離にかける。

沈殿物を回収し、純200ml中に懸濁させ、ウルトラ−タラ（登録商標）によって破砕し、焼結ブフナー漏斗による濾過によって最終的に回収する。

次に沈殿物を5時間40℃で真空乾燥した。

次の性状の中間体8.9gがこのようにして回収された。

コデックスの量	8ul/mg
APTTの量	7ul/mg
抗Xaの量	8u/mg

得られた鎖混合物を実施例1に記載したようにしてゲル濾過にかけた。

実施例12

−毒性

IC1698、1701、1702を、静脈注射及び皮下注射によって15日間マウスに投与したところ、毒性は全く認められなかった。2つのケースにおいて、LD_{50}は、2g/kgよりも高い値を示した。

実施例13

細胞培養物のモデルに対する本発明の生成物の活性

A．モデルの説明

細胞LEII（マウスの肺の内皮細胞）を、融合の¾まで、子ウシの血清10％の存在下に、24ピットの板において培養した。

これらの細胞を血清のみ0.2％中に48時間保持し、静置した。

次に、フィブロブラスト成長因子（FGF）又は試験される少糖類フラグメント又はこれらの両方（FGF＋被験生成物）を媒質に添加した。

次に培養物を24時間保持し、トリチウム標識チミジンを実験終了前4時間目に添加した。

実現された放射能を次にカウントした。各々の測定を3回ずつ行なった。

B．結果

結果は、次の各図に示されている。

第10図−アニオン性FGFのみの存在においての用量−応答曲線

刺激の高原は、5ng/mlの用量について126,000cpmのところにある。以下の各図においてアニオン性FGFのみの存在において最大の刺激は、破線によって示されている。曲線△———△はグリコサミノグリカンのみが用いられた場合に得られる結果を、また曲線•———•はグリコサミノグリカンをアニオン性FGFと共に使用した場合に得られる結果をそれぞれ示している。

第11図は、六糖類IC1696のみを、又はアニオン性FGF（5ng/ml）をも存在させた場合の用量−応答曲線である。

IC1696が培養物の媒質1ml当り0.08〜50μgの用量依存活性を示すことが確められる。

アニオン性FGFとの関係において、10μg/mgから、FGFのみの活性に比較して活性が高くなることも確められる。

実験条件及び細胞系において、IC1696は、アニオン性FGFの活性を強化する。

第12図−六糖類IC1697のみを、又はアニオン性FGFも存在（5ng/ml）させたときの用量−応答曲線。

単独で使用されたIC1697は、0.04〜50μg/mlの範囲の用量依存活性を示す。

モデルの実験条件においてアニオン性FGFと共に使用した場合のIC1697は、0.4μg/mlから確実に強化作用を発揮する。

第13図−アニオン性FGFに対する活性を示さない比較生成物の存在下で、六糖類P38

ＥＸＨ１３を単独でか又はアニオン性ＦＧＦ（５ng／ml）と共に用いた場合の用量－応答曲線。

比較用として用いたフラグメントは、単独で用いた場合、明確な活性を示さなかった。

結論として、この実験モデル（血清なしに静置した細胞）の場合の、ＦＧＦに対して親和性を示す少糖類の効果は、刺激効果（糸状体生成効果）である。

実施例１４

－塩基性ＦＧＦの存在下においての、ウシの大動脈内皮細胞の増殖に対する少糖類の活性

ウシの大動脈内皮細胞を、子ウシの血清１０％を含む変性イーグル培地において、（３５mm四方当り細胞２０，０００個の）低密度で培養した。

細胞を４日間培地に保持し、Ｊ．０日及びＪ＋２日に、濃度８．６pg／μlの塩基性ＦＧＦ溶液１０μlを添加した。

更にＪ．０日に種々の濃度の被検少糖類を培養物に添加した（ただし、或る培養物には、添加しなかった）。４日後に、クールテ粒子カウンターを用いて細胞の数をカウントした。

被検生成物を受けなかった培養物との比較による細胞の増殖の抑制率（百分率）によって結果を表わした。またヘパリンについての試験も比較として行なった。

この結果は次の通りであった。

この結果は、ＤＥ５０、即ち、ＦＧＦを含有しない細胞において得られる細胞の増殖を５０％抑制するために必要な生成物の量として表わした。

被検生成物	ＤＥ５０
ＩＣ１６９６	１．μｇ／ml
ＩＣ１７０１	１．８μｇ／ml
ＩＣ１７０２	４０μｇ／ml
ヘパリン	１．μｇ／ml

比較のため、硝酸による解重合の後にゲル濾過及びイオン交換クロマトグラフィを行なうことによって得た通常の四糖類及び二糖類の活性についても試験した。ＦＧＦに対する親和性をもたないこれらの生成物が使用されたモデルにおいて全く抑制作用を示さないことが確められた。

その反対に、ＩＣ１６９６及びＩＣ１７０１は、ヘパリンとほぼ同じ活性を示し、ＩＣ１７０２は最も強い活性を示した。

実施例１５

ヒトの培養内皮細胞の増殖に対する少糖類の効果

へそ静脈の内皮細胞の１次培養物を、ジャッフ（Jaffe）の方法（J. Clin. Invest. 1973, 52, 2745）に従って調製した。融合の時（５－７日）に、トリプシン－ＥＤＴＡ混合物によって細胞をはがした。これらの細胞は、子ウシの血清（ＳＶＦ）２０％を添加した培地１９９中において５０００細胞／cm²の密度で、２４ピットのファルコン板（フィブロネクチンを予め５μｇ／cm²量被覆する）上に注入した。

２４時間後に、ＳＶＦ１０％を添加した培地１９９に培地を交換し、グリコサミノグリカンを単独にか又は酸性ＦＧＦ（ＦＧＦａ）と共に添加した。４８時間後に成長因子を再び添加した。４日間培養した後、トリプシン－ＥＤＴＡ混合物によって細胞をはがし、細胞カウンター（クールトロニクス社のクールターカウンター、登録商標）を用いて細胞数をカウントした。第１４Ａ～Ｄ図の各々の実験曲線は、３回ずつ行なった１つの実験形式を示している。各々の実験は、２～３回繰返して行なった。

第１４Ａ～Ｄ図において、破線は、ＦＧＦａも少糖類も含有せずＳＶＦ１０％を含有する培養物についての基本的な増殖を表わしている。曲線•——•——•は、ＦＧＦａのみを存在させた比較試験の結果を表わしている。また曲線■——■——■及び▲——▲——▲は、ヘパリン１μｇ／ml及び５μｇ／ml又は少糖類１０μｇ／ml及び５０μｇ／mlの濃度に組合わされたＦＧＦａの存在下に得られた結果をそれぞれ表わしている。

本発明者らの実験条件の下では、少糖類と

組合せられていないＦＧＦａは、濃度１０％のＳＶＦのみに比較して最大で細胞数の２３０％の増加をひき起こし、ＤＥ５０は、７ng／mlである。なおＤＥ５０は、ＦＧＦａ５０～１００ng／mlによって得た最大増殖に対する増殖５０％を定めたＦＧＦａ（ng／ml）の濃度を意味する。

結果

標準のヘパリン出発物質との比較において少糖類の効果を点検した（ロット９１４１６）。

ヘパリンは、選定された実験条件の下において、ＦＧＦａの効果を強化する。この強化作用は、ヘパリン濃度２００ng／mlにおいて開始され、ヘパリン濃度２５μg／mlにおいて最大となる。ヘパリン濃度１μg／mlは、ＦＧＦａのＤＥ５０を1/10に減少させる（第１４Ａ図）。被検少糖類が使用した実験条件に従って種々の効果を示すことが確められた。

１／－ＦＧＦａが存在しない場合には、１～１００μg／mlの濃度において、少糖類は、内皮細胞の成長を抑制する（次表参照）。

ＳＶＦの存在及びＦＧＦａの不在においてヒトの内皮細胞の成長に対してグリコサミノグリカンが示す抑制効果

	抑制率（％）		
	1μg/ml	10μg/ml	100μg/ml
六糖	8.4	25.5	34.9
八糖	5.8	25.4	19.5
十糖	11.0	22.4	10.0

２／－ＦＧＦａの濃度が、ＤＥ５０（７ng／ml）よりも高くなった場合、細胞の成長に対する少糖類の刺激効果のあることが確められる（第１４Ｂ－Ｄ図）。この効果のため、ヘパリンの濃度よりも少糖類の濃度を高くすることが必要となる。最も活性の生成物は、十糖類ＩＣ１７０２である（７０μg／mlにおいてＤＥ５０は３．２μg／mlに降下する）。六糖類ＩＣ１６９６は、細胞成長に対する刺激効果が非常に低い。ＦＧＦａの強化作用は、成長因子に対する少糖類の親和性との良好な相関関係にある。

結論として、実際に行なった試験によって、少糖類の２つの効果、即ち、血清の存在及びＦＡＦａの不在においての抑制効果と、少糖類が親和性を示す成長因子の存在においての刺激効果とが明らかにされる。これは、細胞の成長に対するグリコサミノグリカンの調整剤としての役割を示している。抑制効果は生体内の抗血管形成作用を試みることを可能にする。刺激作用と成長因子との結合は、成長因子の安定化及び強化又は組織の修傷の刺激のために、この生成物の利用を試みることを可能にする。

六糖類ＩＣ１６９６の活性を、Ｊ．フォルクマン(Folkman)等によって適合された抗血管形成モデル〔サイエンス(Science)、１９８３、２２１、７１９）に対して試験した。含浸ポリマーの移植の代りに被検生成物を静脈注射した。

等張力塩化物溶液中六糖類ＩＣ１６９６溶液１０mg／kg（ステロイドと組合されていてもいなくてもよい）の２注射量をウサギに毎日静脈注射

した。

ＩＣ１６９６によって処置した動物においては、等張力の塩化物溶質のみを受けた動物の場合に比べて実質的に少ない血管形成が確められている。特にＩＣ１６９６によって処置したウサギの場合には、２次的な血管形成作用は非常に少くなる。

同一のモデルを使用した最初の試験において、ＩＣ１６９６のみは、抗血管形成作用の抑制効果を示した。

４．図面の簡単な説明

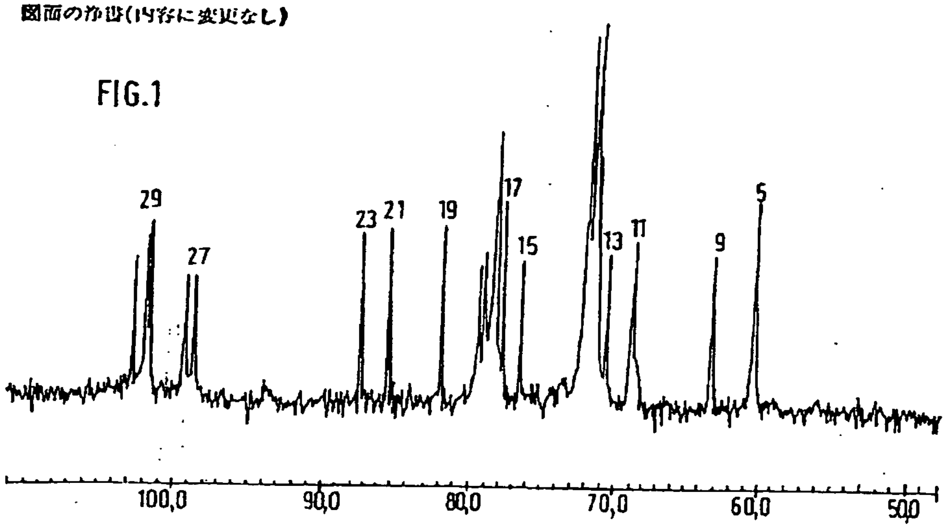
第１図は、強アニオン性の六糖類の^{13}ＣのＲＭＮスペクトルを示す線図、第２図は、硝酸解重合混合物のゲルー沪過に対応する溶離プロフィルを示す線図、第３図は、イオン交換の際にゲルー沪過工程において回収された六糖類フラクションの溶離プロフィルを示す線図、第４図は、ＦＧＦ－セファロース上にクロマトグラフィによって単離された六糖類のイオン交換溶離プロフィルを示す線図、第５図は、アニオン交換カ

ラム上のクロマトグラフィによって得た六糖類のイオン交換クロマトグラフィ溶離プロフィルを示す線図、第6図は、八糖類混合物のイオン交換溶離プロフィルを示す線図、第7図は、この八糖類混合物の^{13}CのRMNスペクトルを示す線図、第8図は、十糖類混合物のイオン交換溶離プロフィルを示す線図、第9図は、この十糖類混合物の^{13}CのRMNスペクトルを示す線図、第10～13図は、アニオン性FGF、六糖類（単独でもアニオン性FGFと併用されてもよい）、別の六糖類（単独でもアニオン性FGFと併用されてもよい）及びアニオン性FGFに対する親和性のない比較生成物（単独でもアニオン性FGFと併用されてもよい）についてそれぞれ得た被検生成物の使用量（ng）の関数としての放射能 cpmの曲線を示す線図、第14A～D図は、種々の条件の下に培養したヒトの内皮細胞の増殖曲線を示す線図である。

７９

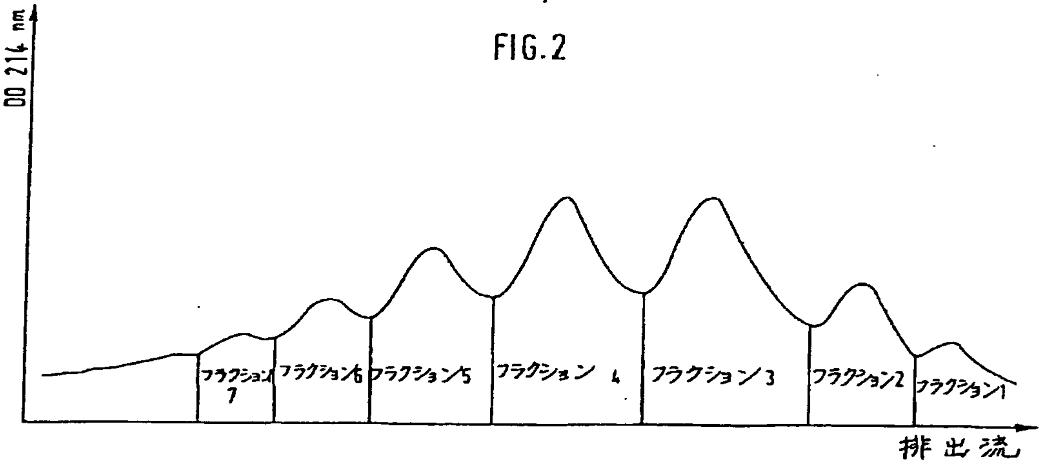
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.1



図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.2



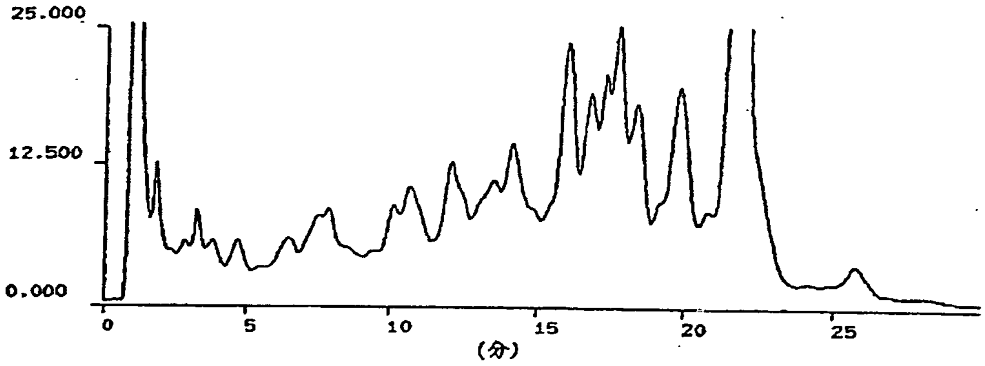


Fig. 3

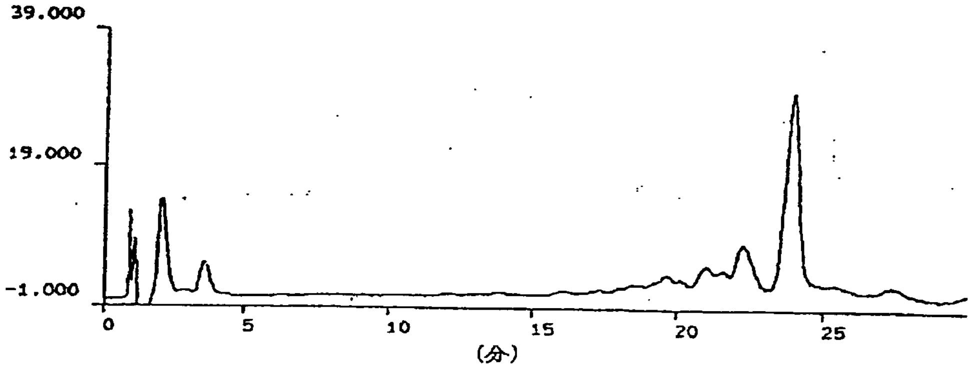


Fig. 4

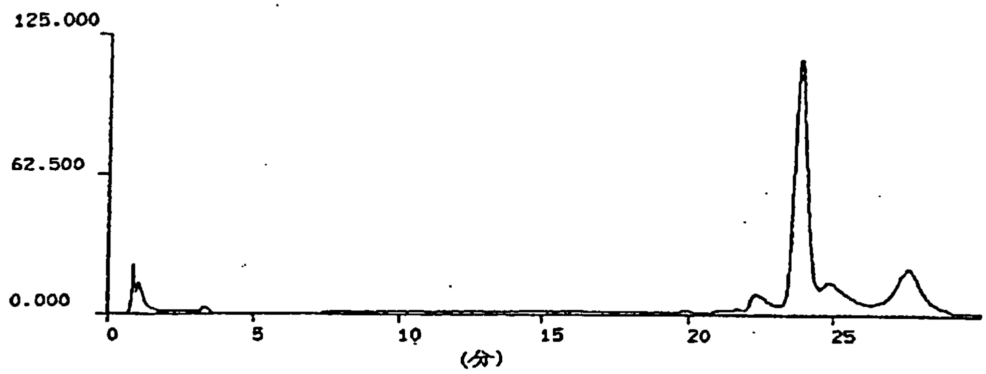


Fig. 5

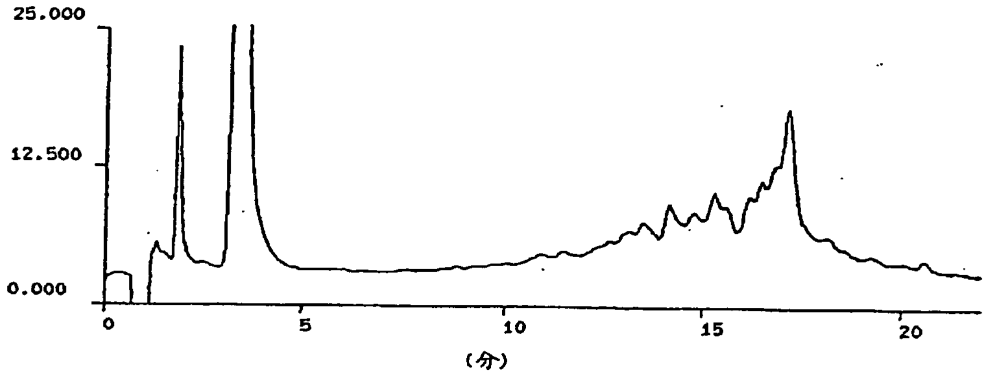
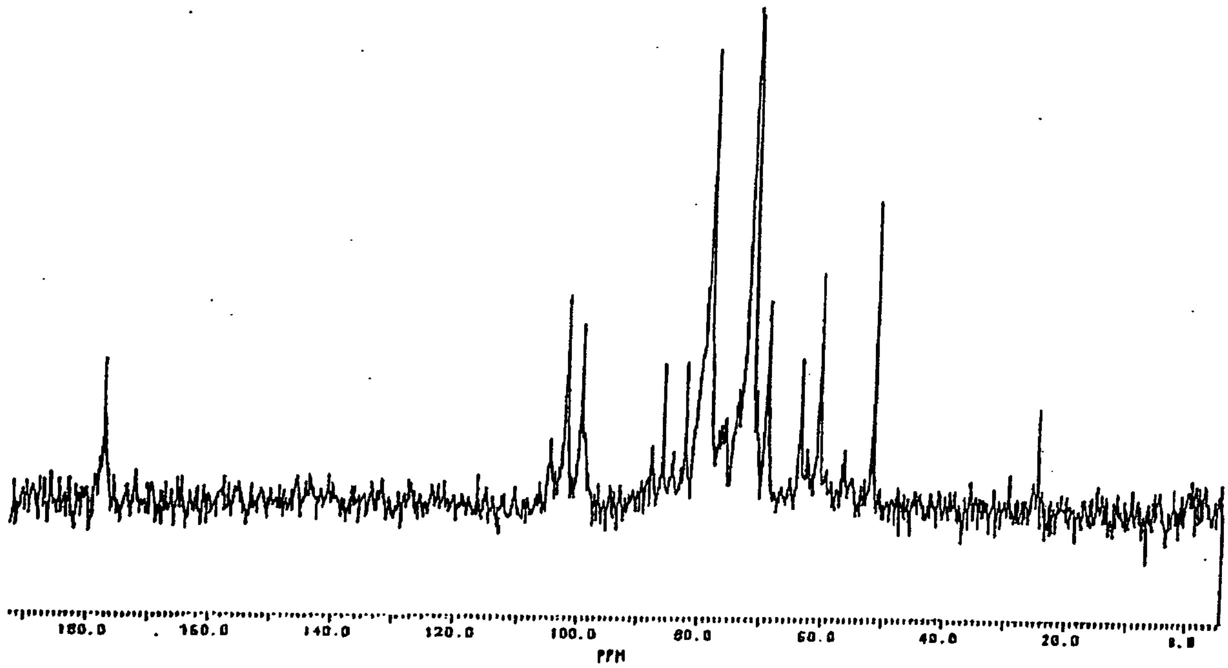


Fig. 6

Fig. 7


180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
PPM

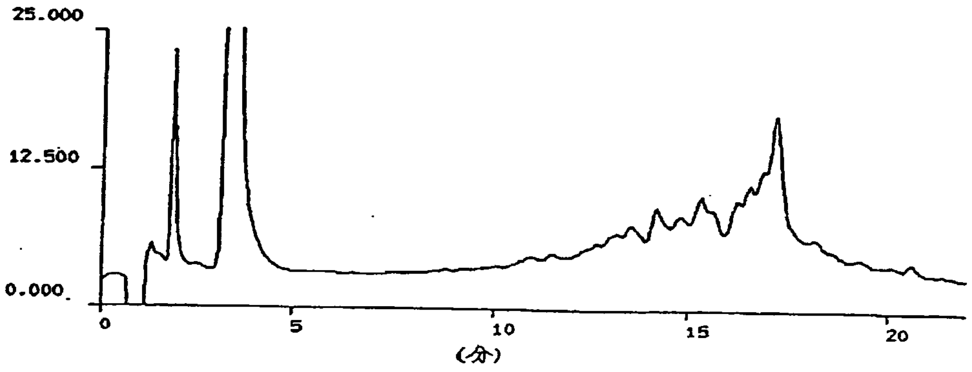
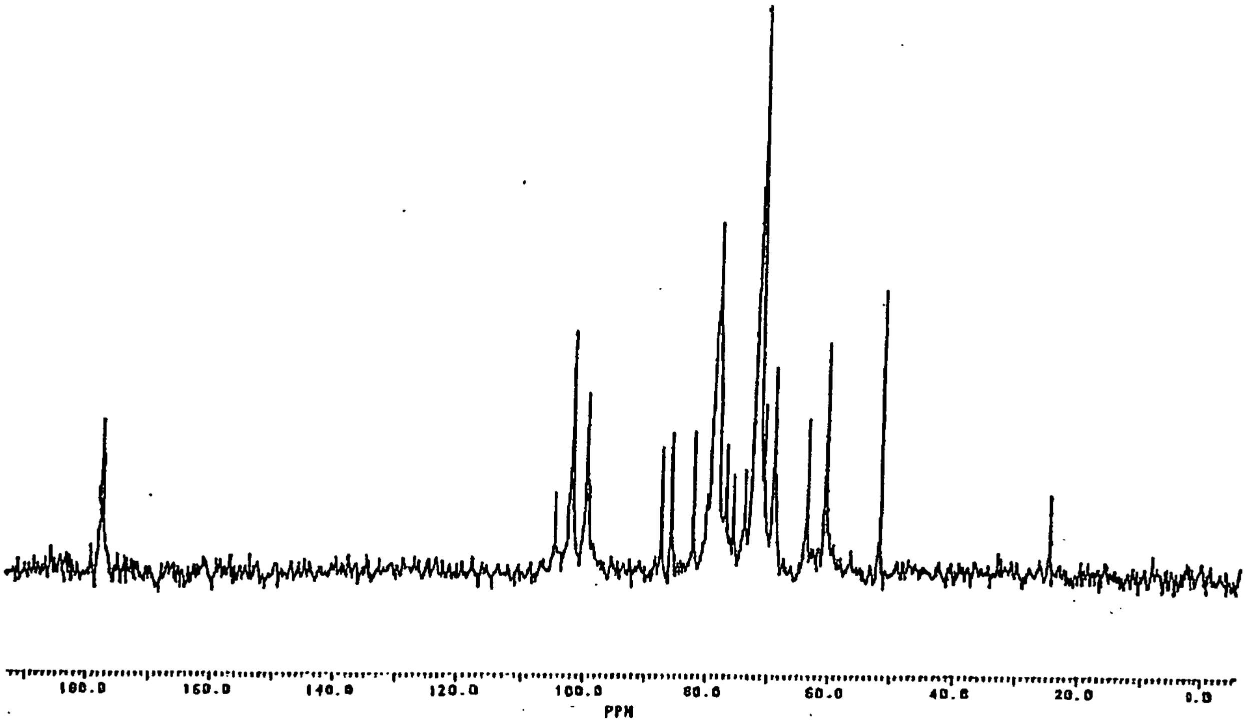

25.000
12.500
0.000
0
5
10
15
20
(分)

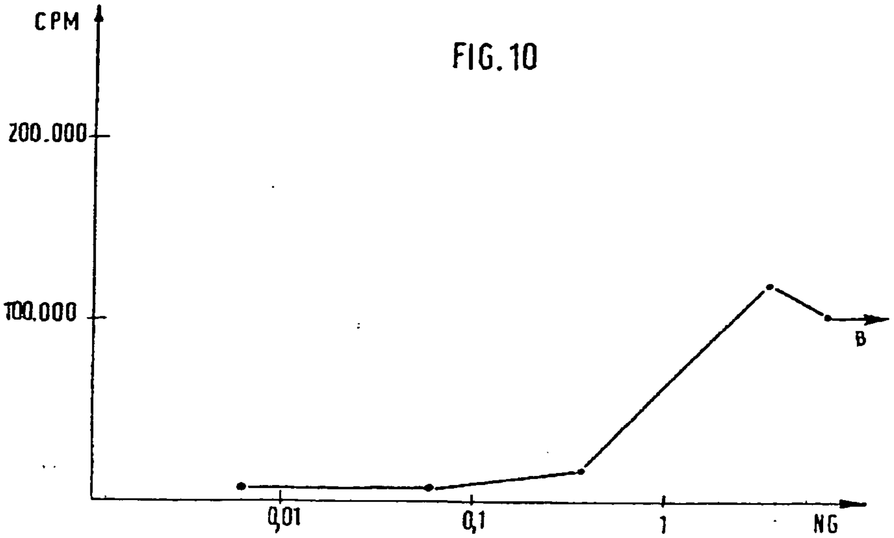
Fig. 8

Fig. 9



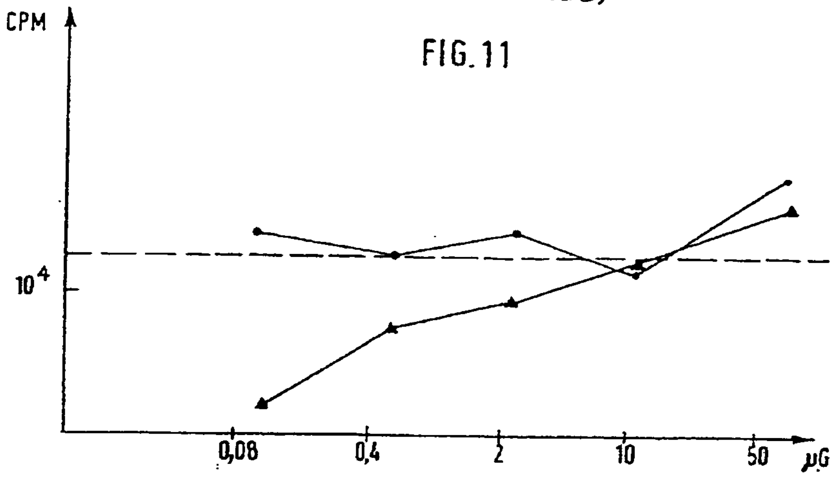
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.10



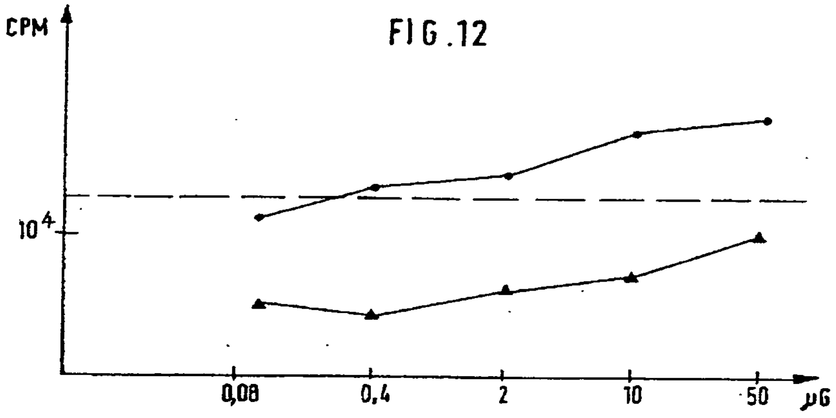
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.11



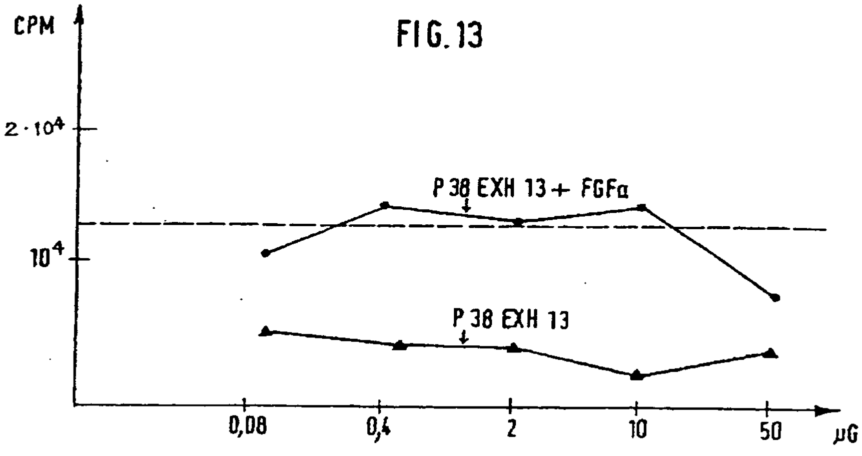
図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.12



図面の浄書(内容に変更なし)

FIG.13



図面の浄書(内容に変更なし)

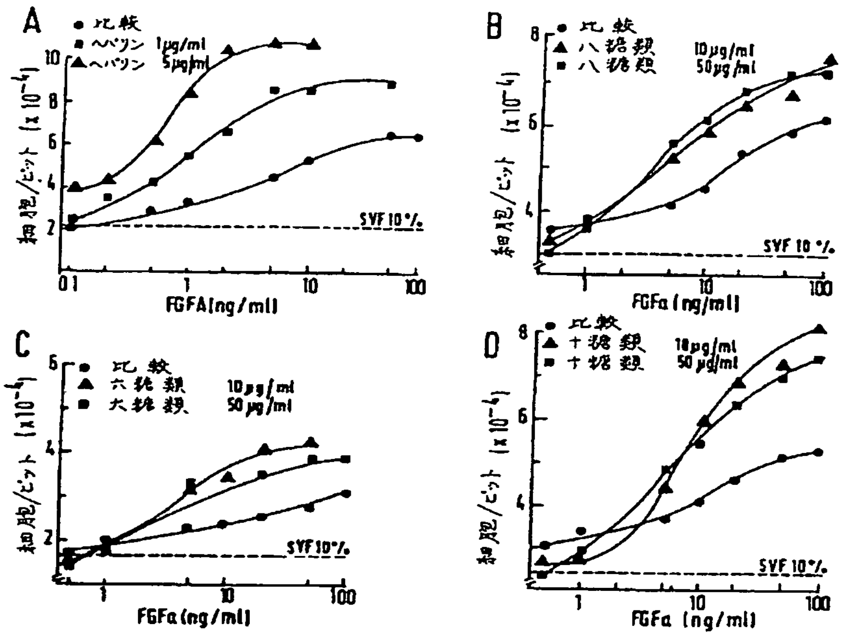


FIG.14

手続補正書(方式)

昭和62年 9月 8日

特許庁長官　小川邦夫殿

1．事件の表示

昭和62年特許願第　92122号

2．発明の名称

細胞の成長因子に親和性を示すヘパリン系少糖類

3．補正をする者

事件との関係　特許出願人

名称　サノフィ

4．代理人

住所　〒107 東京都港区赤坂 2-10-8 第一信和ビル

氏名　弁理士 (7866)　津国肇

5．補正命令の日付　昭和62年 6月30日

6．補正の対象　願書の特許出願人の欄、代理権を証明する書面及び図面(第1，2，10～14図)

7．補正の内容　別紙のとおり(図面は内容に変更なし)

62. 9. 8

方式審査　西村

手続補正書

昭和62年 9月 9日

特許庁長官　小川邦夫殿

1．事件の表示

昭和62年特許願第　92122号

2．発明の名称

細胞の成長因子に親和性を示すヘパリン系少糖類

3．補正をする者

事件との関係　特許出願人

名称　サノフィ

4．代理人

住所　〒107 東京都港区赤坂 2-10-8 第一信和ビル

氏名　弁理士 (7866)　津国肇

5．補正命令の日付　自発

6．補正の対象　図面

方式審査　西村

7．補正の内容　第11図、第12図、第13図を別紙のとおり補正する。

62. 9. 9

FIG.11

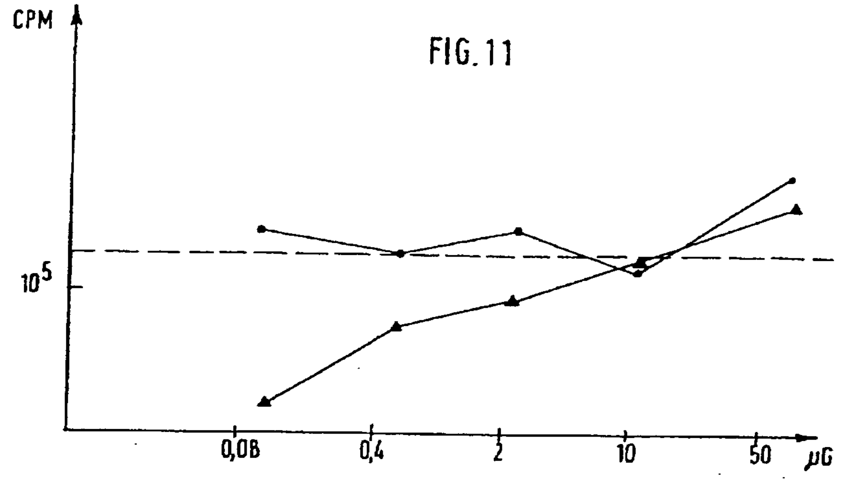


FIG.12

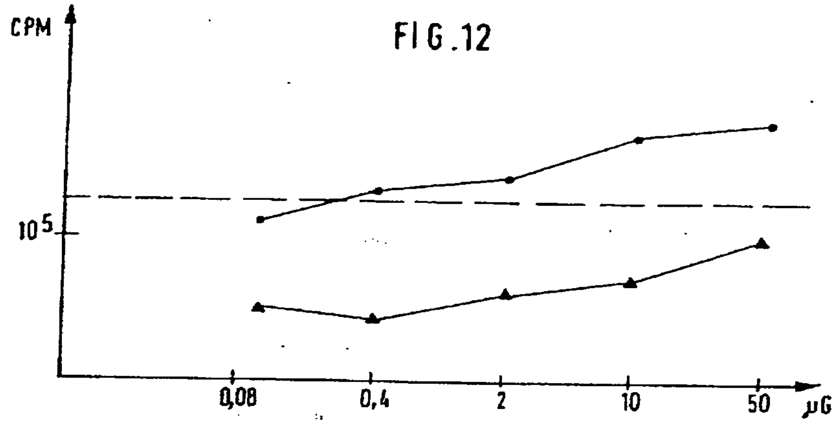
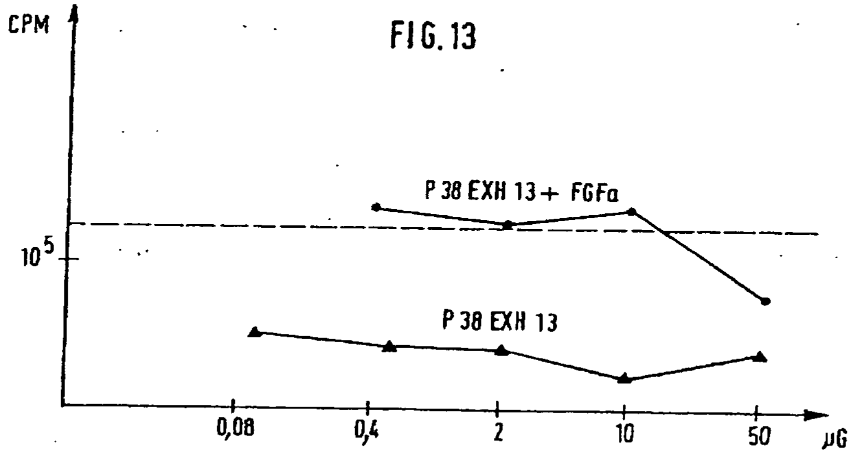


FIG.13



This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☑ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☑ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: ______________________

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)